

Mieczysław Rozmus, Krystyna Piskorek

WPLYW DWUSIARCZANU CZTEROMETYLOTIURAMU /TMTD/ NA PRZEBIEG PODZIAŁÓW
MITOTYCZNYCH W KOMÓRKACH MERYSTEMATYCZNYCH SECALE CEREALE L.

Na przestrzeni ostatnich lat wprowadzono do praktyki rolniczej wiele środków grzybobójczych, stosowanych głównie jako tak zwane zaprawy nasienne. Obok innych stosowana jest również zaprawa nasienna T. Preparat ten zawiera około 50% dwusiarczku czterometylotiuuramu /TMTD/ oraz nośnik mineralny. Składnikiem biologicznie czynnym tego preparatu i działającym toksycznie jest dwusiarek czterometylotiuuramu [1]. Stosowany jest on do zaprawiania nasion oraz odkażania gleby. W przypadku żyta /Secale cereale L./ TMTD polecany jest jako środek niszczący zarodniki oraz grzybnie takich jego pasożytów jak Głównia żdźbłowa Tubercina occulta żyta oraz Pleśń śniegowa Fusarium nivale.

Wiele preparatów grzybobójczych prócz toksycznego działania na określony rodzaj patogenów wpływa również ujemnie na organizm żywiciela. Wpływ ten oczywiście jest różny i na ogół ściśle uzależniony od koncentracji danego preparatu i czasu jego działania, a ponadto nieoobojętnym jest również etap ontogenezy danego organizmu. Organizmy zaawansowane w rozwoju ontogenetycznym są na ogół odporniejsze na szkodliwe działanie tych środków. Niektóre preparaty wpływają na organizm żywiciela jako mutageny chemiczne indukując różne typy mutacji punktowych, takich jak tranzycje, transwersje, delecje czy insercje [5, 8, 11]. Niejednokrotnie indukują one zmiany w strukturze chromosomów, a więc różne typy mutacji chromosomowych oraz zmiany prowadzące do podwojenia lub uwielokrotnienia liczby chromosomów w komórkach somatycznych. Obserwowano również powstawanie komórek dwu- lub wielojądrowych. Powstawanie komórek wielojądrowych względnie jąder poliploidalnych związane jest najczęściej z inaktywacją wrzeciona podziałowego, wywołaną działaniem różnych środków chemicznych. Spośród środków ochrony roślin cytologiczny charakter działania fitotoksycznego poznany został dla takich herbicydów jak profam, chloroprofam, barban oraz EPTC. Większość jednak środków ochrony roślin, a wśród nich zaprawa T, nie było badanych pod tym względem [2, 3, 9].

W związku z powyższym wydało się interesującym stwierdzić, czy zawarty w zaprawie T dwusiarczek czterometylotiuuramu, stosowany w stężeniach zalecanych oraz innych stężeniach, wywiera wpływ na funkcjonowanie komórek merystematycznych w kiełkujących ziarniakach żyta; w szczególności zaś chodziło o wpływ tej substancji na aktywność mitotyczną oraz przebieg mitozy.

M a t e r i a ł i m e t o d y k a b a d a ń

Badania przeprowadzono na ziarniakach *Secale cereale* L., odmiana Smolickie. Pochodziły one ze zbioru 1969 r. i wykazały wysoką zdolność kiełkowania, wynoszącą około 96%. Ziarniaki te sprowadzono z Zakładu Roślin Zbożowych IHAR w Krakowie. Zaprawa nasienna T, którą traktowano ziarniaki pochodziła z Pracowni Ekofizjologii Zakładu Roślin Zbożowych IHAR.

W pierwszej serii doświadczeń wytrząsano ziarniaki o normalnej wilgotności z TMFD, a następnie wysiewano je na bibule filtracyjnej nasyconej wodą wodociągową w szalkach Petriego. Stosowano następujące dawki TMFD, przypadające na 10 g ziarniaków: 0,1 g, 0,2 g, 0,4 g.

W drugiej serii doświadczeń wysiewano ziarniaki w szalkach Petriego na bibule filtracyjnej wysyczonej określoną zawiesiną TMFD. W tej serii stosowano następujące zawiesiny: 1 g TMFD na 100 ml wody, 2 g TMFD na 100 ml wody, 4 g TMFD na 100 ml wody. Równocześnie z materiałem traktowanym wysiano materiał kontrolny. Hodowlę prowadzono w warunkach laboratoryjnych w temperaturze 18°C. Po trzech dniach od założenia doświadczeń obliczono procent skiełkowanych nasion, a następnie zawsze około godziny dwunastej przystępowano do pobierania prób do badań cytologicznych. Wierzchołki wzrostu korzeni utrwalono w uproszczonym utrwalaczu Carno'a; czas utrwalania wynosił 4 godziny. Utrwalony materiał hydrolizowano kwasem solnym, rozcieńczonym wodą destylowaną w stosunku 1:1. Optymalnym czasem hydrolizy DNA w badanym materiale okazał się czas 20 minut. Kolejnym etapem było przeprowadzenie mikrochemicznej reakcji Feulgena. W omawianej reakcji czas traktowania materiału odczynnikami Schiffa wahał się w granicach od 30 do 120 minut. Z tak przygotowanych wierzchołków wzrostu korzeni sporządzono rozgnioty; odwadniano je alkoholem etylowym, butylowym oraz ksylenem, a następnie zamykano w balsamie kanadyjskim.

Analizy cytologiczne preparatów wykonywano przy użyciu mikroskopów optycznych LGOG oraz NfPk Zeiss'a.

W y n i k i b a d a ń

We wszystkich przypadkach traktowanie ziarniaków TMFD spowodowało obniżenie zdolności kiełkowania. Obniżenie to wahało się w granicach od 2 do 4 procent w przypadku wytrząsania ziarniaków z TMFD /tabela 1/, zaś w przypadku stosowania zawiesin TMFD wahało się ono w granicach od 3 do 8 procent.

O b s e r w a c j e c y t o l o g i c z n e

Porównanie wszystkich serii traktowanych z materiałem kontrolnym pozwoliło stwierdzić, że w każdym przypadku dwusiarczek czterometylotiuramu obniżał aktywność mitotyczną komórek merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni. Opisywane doświadczenia przeprowadzono w okresie zimowym, w miesiącu lutym 1970 r. W tym czasie z natury rzeczy aktywność mitotyczna komórek merystematycznych tego gatunku jest niska. W badanym materiale kontrolnym jedynie 700 komórek merystematycznych na badanych 4350 było w trakcie podziału mitotycznego; stanowi to zaledwie 16,09%, mimo, że materiał do analiz cytologicznych utrwalono około godziny dwunastej, to jest o tej porze dnia, kiedy aktywność mitotyczna komórek merystematycznych *S. cereale* osiąga swoje maksimum. W materiale traktowanym procent dzielących się komórek merystematycznych był zawsze niższy. Obserwacje podziałów mitotycznych w korzonkach pochodzących z ziarniaków wytrząsanych z określoną ilością TMFD ujawniły, że procent dzielących się komórek merystematycznych był odwrotnie proporcjonalny do ilości użytego TMFD. Jak widać z tabeli 2 w przypadku stosowania 0,1 g TMFD procent dzielących się komórek wynosił 8,36; podwojenie tej dawki obniżyło aktywność mitotyczną komórek tak, że procent dzielących się w tym przypadku komórek wynosił 4,41, kolejne podwojenie dawki TMFD do 0,4 g powoduje dalsze gwałtowne obniżenie aktywności mitotycznej. W badanym materiale analizowano 25 820 komórek merystematycznych, pochodzących z ziarniaków traktowanych 0,4 g TMFD, w tym jedynie 200 komórek było w stadium mitozy; stanowi to 0,73%. Nieco inną zależność udało się stwierdzić w przypadku stosowania TMFD w postaci zawiesiny. Najniższy procent dzielących się komórek /2,83/ zauważono przy stosowaniu zawiesiny zawierającej 2 g TMFD, natomiast zarówno w przypadku stosowania dawki dwukrotnie niższej jak i dwukrotnie wyższej procent dzielących się komórek merystematycznych był wyższy. W przypadku stosowania 1 g TMFD procent dzielących się komórek wy-

nosił 3,77, zaś w przypadku dawki 4 g TMTD był wyższy i wynosił 5,49. We wszystkich omawianych przypadkach procent aktywnych mitotycznie komórek tkanki merystematycznej był kilkakrotnie niższy aniżeli w materiale kontrolnym.

Na podstawie obserwacji kolejnych etapów podziału mitotycznego udało się stwierdzić, że TMTD wpływa głównie na jądra interfazowe, ograniczając w znacznej mierze ich możliwości podziałowe. Jak widać z tabeli 2, w materiale kontrolnym 11,03% komórek rozpoczynało podział mitotyczny podczas gdy w materiale traktowanym w stadium profazy mitotycznej wchodziło od 0,54% do 5,89% komórek tkanki merystematycznej. Trzeba zaznaczyć, że zdolność wejścia w profazę podziału mitotycznego malała w miarę zwiększania dawki TMTD. Zależność ta została stwierdzona tylko w przypadku wytrząsania ziarniaków z TMTD. Co się tyczy stosowania zawiesin tej substancji, to również we wszystkich seriach tego doświadczenia zaobserwowano wyraźne ograniczenie możliwości rozpoczęcia podziałów mitotycznych badanych komórek jednakże w tym przypadku zwiększenie dawki TMTD przynajmniej w pierwszym etapie działania nie blokowało tak znacznie aktywności mitotycznej komórek. Dalsze stadia podziału mitotycznego przebiegały w większości badanych komórek prawidłowo i prowadziły do powstania komórek potomnych o tej samej co komórki macierzyste liczbie chromosomów.

Niemniej przeto w niektórych komórkach dało się zauważyć pewne nie-normalności dotyczące wielkości i kształtu jąder komórkowych, barwliwości chromosomów oraz ich układu w płaszczyźnie równikowej komórki w czasie metafazy, a ponadto widać było sporadycznie zakłócenia związane z mechaniką rozchodzenia się chromosomów w anafazie. Wydaje się, że nasilenie tych zmian wiąże się zarówno z wielkością stosowanej dawki TMTD jak i z czasem jego działania. Zagadnienia te jednakże ze względu na ich specyfikę będą przedmiotem osobnej pracy.

D y s k u s j a

Przeprowadzone badania cytologiczne pozwalają twierdzić, że dwusiarczek czterometylotiuamu zawarty w zaprawie T wywołuje pewne zmiany w jądrach interfazowych komórek tkanki merystematycznej korzeni *Secale cereale*. Efektem tych zmian jest obniżenie zdolności do podziałów mitotycznych komórek tej tkanki. Na podstawie tego wnosi się, że TMTD zawarty w zaprawie nasiennej T jest substancją mito-depresyjną.

Znaczne obniżenie aktywności mitotycznej komórek merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni *Secale cereale* w wyniku traktowania ich pa-

rami jodu obserwowala również Wajda /1963/. Podobne zjawiska zaobserwowali też Wilson, TeMay i Hypio /1952/ w komórkach merystematycznych *Allium*, pod działaniem cyclochloroheksanu. Jak wynika z badań Kihlmana/1966/ liczne substancje chemiczne, indukujące mutacje, wpływają w pierwszym rzędzie na obniżenie aktywności mitotycznej komórek. Wydaje się, że obniżenie aktywności mitotycznej jest czasowe i związane ściśle zarówno z czasem działania danej substancji, jak i z wielkością jej dawki. Wstępne obserwacje badanego materiału sugerują, że TMTD nie zakłóca w sposób trwały metabolizmu komórki i po przeniesieniu materiału w warunki normalne aktywność mitotyczna komórek stopniowo wzrasta. Po 7 dniach jest ona równa aktywności mitotycznej komórek w materiale kontrolnym. Zagadnienie to jednakże wymaga jeszcze dalszych szczegółowych badań.

Zdecydowana większość badaczy zajmujących się zagadnieniami wpływu różnych substancji na mitozy w komórkach merystematycznych zwraca mniejszą uwagę na aktywność mitotyczną komórek, a interesuje się głównie zmianami strukturalnymi chromosomów oraz przebiegiem kariokinezy /Levann 1949/, Ennis 1948, Crafte 1961/, Koerting-Keiffer o Mickey /1969/ i inni. Takie stanowisko jest w pełni uzasadnione, gdyż anormalności dotyczące struktury chromosomów oraz przekazywanie ich z komórki na komórkę, decyduje o dalszych etapach ontogenezy danego osobnika, oraz o jego genotypie i fe-

T a b e l a 1.

Zdolność kiełkowania ziarniaków *Secale cereale* L., odmiana Smoliczkie traktowanych TMTD i w kontroli.

Sposób traktowania ziarniaków	Zdolność kiełkowania w %	Obniżenie zdolności kiełkowania w %
Wytrząsane		
0,1 g TMTD/10 g	95	3
0,2 g TMTD/10 g	96	2
0,4 g TMTD/10 g	94	4
Zawiesina		
1 g TMTD/100 ml	91	7
2 g TMTD/100 ml	90	8
4 g TMTD/100 ml	95	3
Kontrola	98	

T a b e l a 2.

Częstotliwość mitoz w komórkach merystematycznych korzonków *Secale cereale* L., odmiana Smolicka traktowanych TMTD i w kontroli.

Sposób traktowania	Sproszkowany TMTD g/10 g ziarniaków			Zawiesina g/ml			Kontrola
	0,1	0,2	0,4	1/100	2/100	4/100	
Liczba bada- nych komórek	5260	8380	25820	5570	2295	22910	4350
Interfazy	4820	8010	25620	5360	2230	22650	3650
%	91,64	95,59	99,27	96,23	97,17	94,51	83,91
Profazy	310	250	140	60	40	880	480
%	5,89	2,98	0,54	1,07	1,74	3,84	11,03
Metafazy	40	50	20	50	10	130	120
%	0,76	0,59	0,07	0,89	0,43	0,56	2,75
Anafazy	10	10	30	30	5	100	60
%	0,19	0,11	0,11	0,53	0,21	0,43	1,37
Telofazy	80	60	10	70	10	150	40
%	1,52	0,71	0,03	1,25	0,43	0,65	0,91
Ogółem mitoz	440	370	200	210	65	1260	700
%	8,36	4,41	0,73	3,77	2,83	5,49	16,09

LITERATURA

- [1] Babaniuk J., Dulski H., Ostrowski J., 1963. Ochrona Roślin 1.21.
- [2] Crafts A. S., 1961. The Chemistry and Mode of Actions of Herbicides. N. York-London.
- [3] Dawson J. H., 1963. Weeds 11., 60.
- [4] Ennis W. B., 1948. Amer. J. Bot. 35, 18.
- [5] Janion C., 1969. Post Biochem. 15: 591-612.
- [6] Kihlman B. A., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, A.J.
- [7] Koerting-Keiffer L. E., Mickey G. H., 1969. Zeitschrift für Pflanzen. 61: 244-251.
- [8] Levan A., 1949. Hereditas Suppl. Vol. 325-337.
- [9] Ostrowski J., 1965. Post. Nauk Rol. 4: 65-91.
- [10] Wajda L., 1963. Acta Soc. Bot. Pol. 32: 553-573.
- [11] Wilson G. B., Te May Tsou, Hyppio P. 1952. Journ. Hered. 43: 211-215.

Mieczysław Rozmus, Krystyna Piskorek

THE EFFECT OF TETRAMETHYLOTURAM DISULPHATE /TMTD/ ON THE PROCESS OF MITOTIC DIVISIONS IN MERISTEMATIC CELLS OF SECALE CEREALE L.

It has been found by analysis that the tetramethyloturam disulphate contained in the seed dressing T reduces the mitotic activity of meristematic cells of conical growing points of *Secale cereale* L. The decrease of the cell's divisibility varied according to the size of the TMTD dose applied.

In most of the examined cells, the successive stages of karyokinesis have followed a normal course; nevertheless, however, in a few cells certain irregularities have been detected, which in all probability were the result of intra-chromosomal changes brought about by TMTD. The problem will be presented in a separate paper.

Мечислав Розмус, Кристина Пискорек

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАМЕТИЛТИУРАМДИСУЛЬФИДА /TMTD/ НА ПРОЦЕСС МИТОТИЧЕСКОГО ДЕЛЕНИЯ В МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ SECALE CEREALE L.

На основании опытов авторы установили, что тетраметилтиурамдисульфид, входящий в состав програвителя, понижает митотическую активность меристематических клеток

конусов нарастания *SECALE CEREALE L.* Понижение способности клетки к делению зависело от величины применявшихся доз мутагена ТМТД.

Ход очередных фаз карิโอкинеза был в большинстве исследованных клеток правильным. Вместе с тем в немногих клетках были обнаружены некоторые неправильности, являющиеся по всей вероятности последствием вызванных ТМТД перемен в хромосомах. Этому вопросу авторы намерены посвятить отдельную статью.